The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)　アイソザイムに関する研究
Author(s)	鏡山, 博行
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28888
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【26】

氏名・(本籍)	鏡山博行（かがみやまひろゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 882 号
学位授与の日付	昭和41年3月28日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) アイソザイムに関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 坂本 幸哉　教授 須田 正巳

論文内容の要旨

〔研究目的〕

Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (GOT) は自然界にひろく分布し，活性も強く，古くから数多くの研究がなされている。最近細胞上清画分とミトコンドリア画分の双方に性質の異なる二種のGOT が存在することが知られ，いわゆるアイソザイムとしても注目されている。森野らは牛肝臓より両種 GOT を結晶状にとり出すことに成功したが，筆者はその方法を改良してブタ心臓に適用し，両 GOT の反応動力学的，蛋白化学的，免疫化学的性質の差異をより一層明確にすることができた。以後上清画分の GOT を s-GOT，ミトコンドリア画分の GOT を m-GOT と記載する。

〔実験方法〕

酵素活性測定：① 酵素，α ケトグルタール酸（α-KG.），アスパラギン酸（Asp.）を反応させ，生ずるオキザロ酢酸を焦性ブドウ酸に変え，その 2.4-Dinitrophenydrazone として比色定量する。② 生成したオキザロ酢酸を Malic Dehydrogenase と DPNH を共存さすことによって還元し，その際の DPNH の減少を測定する。

N 末端アミノ酸分析：Sanger の DNP 法，Edman の PTC 法によった。

分子量測定：Spinco Model E を用い，アーチバルド法によって求めた。

アミノ酸分析：6 N—HCl, 24時間，110°C で加水分解後，アミノ酸自動分析機で行なった。（蛋白研）

酵素：新鮮な豚心筋の0.25 M sucrose 溶液より Hogeboom の方法で上清画分とミトコンドリア画分を得る。それより別々に硫安分画，熱処理，CM セルローズカラム，DEAE セルローズカラムによるクロマトグラフイーによって s-GOT では約500倍，m-GOT では約200倍に精製。濃縮液に

細砕した固型硫安を徐々に添加して結晶化した。

抗体：結晶 GOT を家兎の筋肉に Freund の complete adjuvant とともに注射し，3週間後追加免疫を行ない，抗体活性が上昇していることを確めた後採血。Kekwick の方法で γ-グロブリンを精製して用いた。

PCMB と SH 基の反応：Boyer の 方法で 250mμ におけるメルカプタイドの吸収増大で測定。

〔実験結果〕

① 反応動力学的生質

Malic Dehydrogenase-DPNH を共軛させて初速度を正確に測定し，Velick の方法で作図して基質に対するKmを求めると，α-KG. に対しては s-GOT 0.3mM，m-GOT 1.0mM，Asp. に対しては s-GOT 2.5mM，m-GOT 0.5mM と，両者で異なる結果を得た。またこの作図法より両 GOT とも binary mechanism で反応が進行していることが解析された。

② 免疫化学的性質

すでに牛肝臓酵素の場合に示されている如く，豚心臓の場合にも両 GOT は全く異なった抗原性を示すことが，酵素活性阻害，定量沈降反応，Ouchterlony のゲル内沈降反応で認められた。また，牛肝臓酵素とはそれぞれ spur を形成した。

③ 蛋白化学的性質

(1) SH 試薬による影響：s-GOT は6つの SH 基が PCMB によって滴定されるが，最初に反応する2つの SH 基は活性に影響を与えず，それ以後は PCMB と結合することにより次第に失活する。これに対し m-GOT は3ケの SH 基までは活性に影響なく，それ以後徐々に影響が出てくるが s-GOT にくらべるとその程度はゆるやかである。

(2) 尿素の影響：尿素中での安定性には s-GOT と m-GOT の間で著しい差異が認められた。すなわち m-GOT は酸性側で著しく不安定で低濃度の尿素によって，また短時間に失活するが，アルカリ性では比較的安定である。一方 s-GOT はあまり pH の影響をうけない。8 M尿素中で分子量を計算すると，m-GOT は½になり，解離のおこっていることが示されたが，s-GOT は解離がおこったという確証は得られなかった。

(3) アミノ酸分析：全体として両 GOT 間に大きな差は認められないが，m-GOT ではメチオニンとリジンが，s-GOT ではロイシンが他方より多い。

(4) N末端アミノ酸：s-GOT の N 末端がアラニンであり，それが2残基であることは既に報告されている。筆者はそれを追試確認するとともに，m-GOT では DNP 法エーテル可溶部分よりペーパークロマト上 DNP セリンに相当するスポットを得，さらにそれを加水分解し，遊離のアミノ酸としてペーパークロマトを行ないニンヒドリン発色でセリンであることを確認した。しかしこの状態ではメチオニンの酸化物であるメチオニンスルフオキサイドも同じ態度を示すので，PTC 法を行ない，N 末端がメチオニンであることを否定した。収量を計算して残基数2と決定し，m-GOT もダイマー構造をとっていることを示した。

〔総　　括〕

① s-GOT と m-GOT は基質に対する Km が異なっているが，反応機構は同一と考えられる。

② s-GOT と m-GOT は抗原性を全く異にする。

③ 酵素の SH 基と PCMB の結合によって活性に与える影響は両 GOT 間に差がある。

④ 尿素中で m-GOT はアルカリ性よりも酸性の方が著しく不安定になるが，s-GOT は pH による影響は著明でない。

⑤ 8M尿素中で m-GOT は分子量が半分になり，解離がおこっているものと思われる。

⑥ アミノ酸組成は両 GOT 間で著しい差は認められず，m-GOT ではメチオニン，リジン，s-GOT ではロイシンが他方より多い。

⑦ N末端アミノ酸は s-GOT がアラニン，m-GOT はセリンである。残基数は両者とも 2 である。

論文の審査結果の要旨

Glutamic-oxaloacetate transaminase (GOT) は数多くのトランスアミネースの中でも，各方面から最も研究されている酵素である。最近，細胞内局在を異にして二種の GOT が存在することが判り，アイソザイムとしても注目されているが，両酵素を詳細に比較検討した例は極めて少ない。特に s-GOT（上清画分の GOT）はかなり詳しく研究されているが，m-GOT（ミトコンドリア画分の GOT）については，ほとんど知られていない。著者は両 GOT を別々に均一な酵素としてとり出し，反応動力学的，免疫学的，蛋白化学的に探索し，両 GOT が同じ酵素作用を有しながら，まったく異なった蛋白構造を有していることを示した。すなわち，反応動力学では，基質や生成物の阻害を除き初速度を正確に測定することにより，両者の反応は同一の機構で進行するが，基質に対する親和性が異なることを明らかにし，免疫学的にも交叉反応を示さないことから抗原性がまったく異なっていることを証明した。また SH 基がマスクされていく際の両者の活性に対する影響の現われ方や，尿素溶液中で示す態度が両 GOT の間に大きな差のあることを見出し，内部構造もかなり異なっていることを予想している。さらにアミノ酸分析，N 末端アミノ酸分析を行なって，両 GOT の違いを具体的に証明した。すなわち，s-GOT の N 末端はアラニンであり，m-GOT の N末端はセリンであった。またm-GOT が s-GOT 同様ダイマー構造であることも明らかにした。

これらの実験結果は，蛋白合成の面からも，両 GOT が異なった遺伝子に支配されている可能性を含んでおり，特にミトコンドリア内の蛋白代謝の面からも興味深く，将来えの発展性が期待できる。

アイソザイムを蛋白化学的に詳しく検討している例はわずかに乳酸脱水素酵素にみられるにすぎず，本論文は今後のアイソザイム研究の道に大きく貢献したものとして，十分学位に値するものである。